

# ラットガラクトース白内障に対する アルドース還元酵素阻害剤の前投与効果

辻 俊明<sup>1)</sup>, 岡本庄之助<sup>1)</sup>, 池部 均<sup>1)</sup>, 照林 宏文<sup>1)</sup>, 赤木 好男<sup>1)</sup>, 谷本 剛<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>京都府立医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>国立衛生試験所

## 要 約

ガラクトース投与前に与えたアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) が白内障を抑制する作用をもつかどうかを調べた。44匹のラットには一定期間 ARI を投与したのちガラクトース食を与えた。対照として別の44匹のラットには ARI を前投与せず、ガラクトース食を与えた。両群とも経時的に水晶体を摘出して水晶体の形態および生化学的ガラクトチトール量を調べ、ARI を前投与した群では白内障が抑制されるかどうかを検討した。形態的には ARI を前投与したラットでは、前投与しないラットにくらべて生じる白内障の程度が軽かった。また水晶体中ガラクトチトール量は ARI を前投与したラットでは前投与しない群にくらべて有意に低い値を示した。以上のことより、前投与された ARI はガラクトース白内障を抑制する働きがあるということが明らかとなった。(日眼会誌 97: 455-459, 1993)

キーワード: ガラクトース白内障, ラット, 前投与, アルドース還元酵素阻害剤, ガラクトチトール

## Prefeeding of Aldose Reductase Inhibitor Inhibits Galactose Cataract

Toshiaki Tsuji<sup>1)</sup>, Shounosuke Okamoto<sup>1)</sup>, Hitoshi Ikebe<sup>1)</sup>  
Hirofumi Terubayashi<sup>1)</sup>, Yoshio Akagi<sup>1)</sup>  
and Tsuyoshi Tanimoto<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine,

<sup>2)</sup>National Institute of Hygienic Sciences

## Abstract

To examine the effect of prefeeding the aldose reductase inhibitor (ARI) on the cataract induced by the subsequent feeding of galactose diet, rats were first fed rat chow with or without ARI for 2 weeks. The animals were then transferred to a 25% galactose diet for different periods of time. Lenses were enucleated and examined by light microscopy. The amount of galactitol in the lenses was examined biochemically. The cataract was less severe and there was less galactitol in the lenses in the rats first fed with ARI than in those without ARI. These results indicate that the feeding the ARI prior to galactose feeding partly inhibits galactose cataract. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 455-459, 1993)

**Key words:** Galactose cataract, Rat, Prefeeding, Aldose reductase inhibitor, Galactitol

別刷請求先: 602 京都市上京区河原町通広小路ル 京都府立医科大学眼科学教室 辻 俊明  
(平成4年6月22日受付, 平成4年10月26日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiaki Tsuji, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto prefectural University of Medicine, Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan  
(Received June 22, 1992 and accepted in revised form October 26, 1992)

## I 緒 言

我々は今までヒト糖尿病白内障のモデルとして、ラットガラクトース白内障を形態学的に研究してきた。そして種々のアルドース還元酵素阻害剤(ARI)の経口あるいは点眼投与がガラクトース白内障を抑制、治療することを報告してきた<sup>1)~4)</sup>。しかし今のところガラクトース投与前に与えたARIが白内障を抑制する作用をもつかどうかは明らかではない。ARIはまたヒト糖尿病白内障に対しても有効である可能性があり<sup>5)</sup>、将来臨床に応用されることも考えられるので、ARIの抗白内障作用を十分把握しておくことは重要である。そこで本研究では、ラットにガラクトース投与前の一定期間ARIを経口投与し、ガラクトース白内障に及ぼす影響を形態学的、および生化学的に検討した。

## II 実験方法

### 1. 実験動物

生後4週齢(体重およそ80g)のSD系ラット88匹を44匹ずつ以下の2群に分け飼育した。なお本実験で使用したARIは0.075%FR74366(藤沢薬品)<sup>2)</sup>である。

1) 2週間ARIの入った通常研究室用食餌(オリエンタル酵母工業)を与え、のち25%ガラクトース食を与えた(ARI投与群)。

2) 2週間通常研究室用食餌のみを与え、のち25%ガラクトース食を与えた(ARI非投与群)。

ガラクトース食に変換後、5、7、10、14、21、28日目に各群のラットの眼球を摘出し、水晶体をとりだし、組織学的観察および生化学的ガラクトール量測定を行った。組織学的観察に用いた眼数は5日目ではARI投与群、非投与群とも9眼、7~28日目では各々7眼である。生化学的ガラクトール量測定に用いた眼数は5日目ではARI投与群、非投与群とも8眼、7~28日目では各々6眼である。

### 2. 組織学的観察

水晶体を4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M磷酸緩衝液(pH7.4)で1~2日間固定し、アルコール系列にて脱水し、包埋剤(JB-4)に包埋した。1~2 $\mu$ の切片を作成し、トルイジン青で染色し、光顕にて観察した。

### 3. 生化学的ガラクトール量測定

水晶体中ガラクトール量は、Dethy<sup>6)</sup>の方法に従

い、液体クロマトグラフィーにて分析した。レンズあたり(wet weight)のガラクトール量を測定し、各群とも平均値と標準偏差を求めた。有意差検定にはt検定を用い、危険率(p)<0.05あるいはp<0.01を統計的に有意とした。

## III 結 果

### 1. 組織学的観察所見

ガラクトース食に変換後10日目まではARI投与群、非投与群とも水晶体は正常であった(図1)。食餌変換後14日目になると、ARI投与群、非投与群とも水晶体線維に膨化がみられた。しかし、線維膨化の範囲は両群で異なっていた。すなわちARI投与群では、前皮質に限局した線維膨化が出現したのに対し(図2)、ARI非投与群では前皮質と後皮質に膨化がみられた(図3)。しかしいずれの群でも赤道部の線維には異常

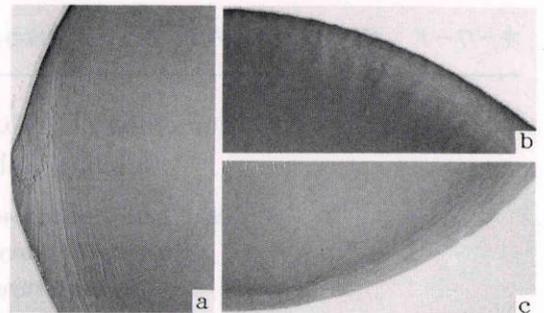


図1 ARI非投与群、ガラクトース食に変換後7日目の光顕像。  
赤道部(a)、前皮質(b)、後皮質(c)とも水晶体は正常である。(トルイジン青染色、 $\times 33$ )

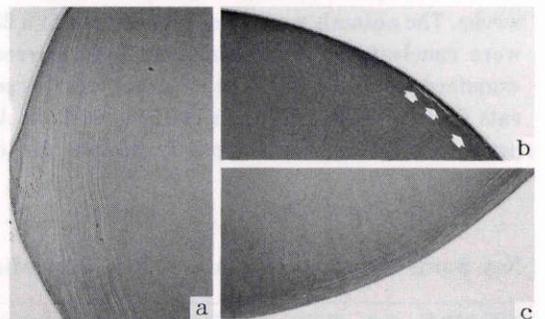


図2 ARI投与群、ガラクトース食に変換後14日目の光顕像。  
前皮質(b)に軽度の線維膨化がみられる(矢印)。(トルイジン青染色、 $\times 33$ )

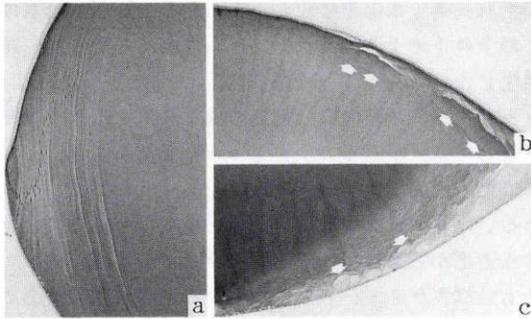


図3 ARI 非投与群, ガラクトース食に変換後 14 日目の光顕像。  
前皮質 (b) と後皮質 (c) に線維膨化がみられる (矢印). 赤道部 (a) は正常である. (トルイジン青染色,  $\times 33$ )

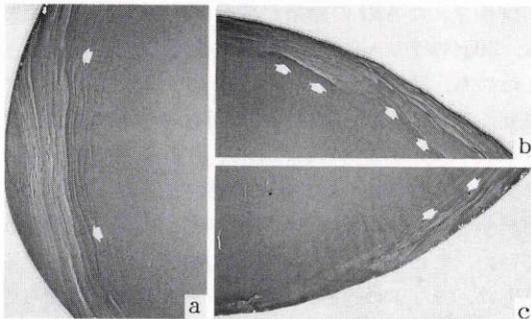


図4 ARI 非投与群, ガラクトース食に変換後 28 日目の光顕像。  
比較的大きな液化, 膨化領域が前皮質 (b), 後皮質 (c) にみられ, 赤道部 (a) 深層皮質の線維も軽度膨化している (矢印). (トルイジン青染色,  $\times 33$ )

はみられなかった。これらの所見は食餌変換後 21 日目でも同様であった。食餌変換後 28 日目になると、両群とも線維膨化の範囲はやや広がりを見せた。そして両群で膨化の程度の差はみられなくなった。すなわち、両群とも前、後皮質に線維膨化がみられ、さらに赤道部深層皮質の線維も軽度膨化した。そして前、後皮質の膨化領域と水晶体嚢との間には非膨化線維が介在した(図4)。以上の組織像は各個体によって多少のばらつきはあるものの実験に用いたラットすべてにみられた。

2. 生化学的測定結果

水晶体中のガラクトチール量をレンズあたりで示す(表1, 図5)。ARI 投与群, 非投与群ともガラクトース食に変換後, 水晶体中のガラクトチール量は増加し、

表1 水晶体中ガラクトチール量

日	ガラクトチール (mg/g wet weight lens)		有意差
	ARI 投与群	ARI 非投与群	
5	6.77 $\pm$ 1.45(8)	8.36 $\pm$ 1.13(8)	p<0.05
7	9.23 $\pm$ 1.23(6)	11.22 $\pm$ 0.65(6)	p<0.01
10	10.43 $\pm$ 0.30(6)	11.43 $\pm$ 0.57(6)	p<0.01
14	9.51 $\pm$ 1.02(6)	11.14 $\pm$ 1.03(6)	p<0.05
21	9.25 $\pm$ 0.49(6)	10.64 $\pm$ 0.93(6)	p<0.01
28	7.28 $\pm$ 0.25(6)	7.48 $\pm$ 1.06(6)	—

カッコ内は使用眼球数を示す。なお有意差検定には t 検定を用いた

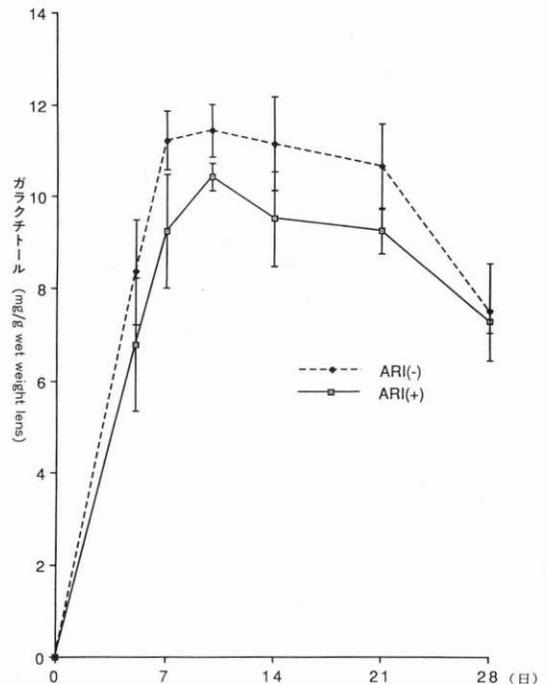


図5 水晶体中ガラクトチール量。

表1をグラフにしたもの。横軸はガラクトース食に変換後の日数を示す。ARI(+)はARI投与群, ARI(-)はARI非投与群を示す。

10日目にはピークをむかえ、その後減少したが、5日~21日目を通じてARI投与群では非投与群より有意に低値を示した (p<0.05あるいはp<0.01)。

IV 考 按

ラットにガラクトースを与えると、ガラクトースはアルドース還元酵素 (AR) の働きによってガラクトチールに還元される。このガラクトチールは膜透過性が低いため水晶体線維内に蓄積され、そのため浸透圧が上昇し、その結果水晶体線維が水分を吸収し膨化、

白濁するに至る。これがガラクトース白内障発症のメカニズムである<sup>7)</sup>。一方、高血糖状態においては、グルコースはARにより同様にソルビトールに還元されて蓄積し、浸透圧作用により水晶体線維を膨化させる<sup>78)</sup>。つまり、ガラクトース白内障と糖尿病白内障とはARに関しては同じ機序で生じると考えられる。したがって、この観点からみた場合ガラクトース白内障は糖尿病白内障のモデルとみなすことができる。

アルドース還元酵素阻害剤(ARI)はARの働きを阻害することによって糖白内障を抑制すると考えられている<sup>19)</sup>。我々<sup>2)</sup>はさきにFR 74366が濃度依存性にラットガラクトース白内障を抑制、治療し、今回の実験で使用した薬剤である0.075%FR 74366は強い作用を持つことを報告した。その中ではFR 74366はガラクトース投与と同時に、あるいはガラクトース投与後に与えられている。これに対して本実験ではARIはガラクトースを投与する前に与えられており、この条件下で白内障が抑制されるかどうかを調べたわけである。つまりこの実験の目的は、ARI投与を中止したあとみきつづきARIの作用が存続するののかという事を調べることであり、このことは臨床に本薬剤が応用されたときに生ずる作用、副作用を理解する上に有用であると考えられる。

本実験では白内障の進行状態を判定するために、水晶体を組織学的に観察し、さらにガラクトースの代謝産物であるガラクトチオール量を生化学的なパラメーターとして測定した。まず水晶体組織をみると、ガラクトース食に交換後ARI投与後、非投与群とも線維膨化がみられたが、その程度には差が認められた。すなわち食餌交換後2～3週目において、ARI投与群で膨化の程度は軽く、非投与群で強かった。つぎに水晶体中のガラクトチオール量をみると、ガラクトース食に変換後、ARI投与群でも非投与群でもガラクトチオール量は上昇しているが、5日目から3週までの間ARI投与群の方が非投与群よりも低い値を示している。このことは、ARI投与群ではこの期間ガラクトチオールの蓄積が抑制されている事を示している。従って、ARI投与群と非投与群との間で形態的にみられた白内障の程度の差は、水晶体に蓄積したガラクトチオール量の差によって生じたと解釈できる。4週目になると両群とも白内障が進行しており、両群の間で線維膨化の程度に差が認められなくなっている。この時期のガラクトチオール量は、両群でほとんど差がなくなっており、このために形態的にも差がみられなくなったのであろう。1週

目では両群とも線維膨化がみられなかったが、これはこの条件下で1週間ガラクトースを負荷しても白内障は生じないということである。

ガラクトース白内障の進展様式を決定する大きな要素としては、与えるガラクトースの濃度およびラットの成熟度がある<sup>3)4)10)</sup>。一般的に、ラットが幼若である、あるいは負荷するガラクトースの濃度が高いと、水晶体赤道部から膨化が始まるが、ラットが成熟である、あるいはガラクトース濃度が低い場合には前皮質あるいは後皮質から線維膨化が始まる。今回の実験では、ARI投与群、非投与群とも前、後皮質に膨化が初発しており、両者の間で進展様式には差はなかった。しかし白内障の進行する速度がいくぶん異なっていたためある期間内白内障の程度に差が出たものと思われる。

過去にはUnakarら<sup>11)</sup>により同様の実験がなされ、前投与されたARIの効果調べられている。その中では、50gのラットに2週間ARI(E-0722, Eisai)を与えたのち、50%ガラクトース食が与えられている。つまり、我々の実験と比較して幼若なラットに高濃度のガラクトースが与えられており、生じる白内障も今回の実験とはちがって早期から高度であったが、ARIが前投与されているものでは明らかに白内障が抑制されていた。この結果と我々の実験の結果によってわかることは、ラットの週齢、ガラクトース濃度が異なっても前投与されたARIはガラクトース白内障を抑制する働きがあるという事である。ところでARIのもつこの作用はARIの代謝される速度に関係すると思われる。すなわちARIはすぐには代謝されずしばらくの間は薬効を保つのであろう<sup>11)</sup>。すべてのARIが同様の効果をもつかどうかは明らかではない。ラット糖白内障発症メカニズム解明の研究から生まれたARIは、その後多くの研究から糖尿病合併症すべてに治療効果を有する可能性が指摘された。とりわけ糖尿病神経症に臨床的効果が証明され、今日臨床的に使用できることになった。今後ますますARIの作用、副作用を考慮せねばならず、この意味から本実験の結果は重要な知見であると考えられる。

本論文の要旨は第96回日本眼科学会総会で発表した。

#### 文 献

- 1) 赤木好男, 秋宗万理, 中路 裕, 田坂 宏, 茶本 薫, 糸井素一: Aldose reductase 阻害剤(ICI. 128. 436)その1. ラットガラクトース白内障に対する効果. 眼紀 37: 991-995, 1986.
- 2) 辻 俊明, 松本康宏, 森 和彦, 池部 均, 照林宏文, 赤木好男, 他: 新しいアルドース還元酵素阻害

- 剤 (FR74366) のラットガラクトース白内障に対する効果. 日眼会誌 94: 120—127, 1990.
- 3) 赤木好男, 照林宏文, 池部 均, 岡本庄之助, 高橋幸男, 辻 俊明, 他: ラットガラクトース白内障の発症・進展について. 眼紀 40: 1985—1991, 1989.
  - 4) 池部 均, 照林宏文, 辻 俊明, 高橋幸男, 松本康宏, 森 和彦, 他: アルドース還元酵素阻害剤の白内障抑制効果. 形態学的判定基準について. 臨眼 44: 514—515, 1990.
  - 5) **Kador PF**: Overview of the current attempts toward the medical treatment of cataract. *Ophthalmology* 90: 352—364, 1983.
  - 6) **Dethy JM, Callaert-Deveen B, Janssens M, Lenaers A**: Determination of sorbitol and galactitol at the nanogram level in biological samples by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 143: 119—124, 1984.
  - 7) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. *Invest Ophthalmol* 4: 786—799, 1965.
  - 8) **Kinoshita JH**: Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol* 13: 713—724, 1974.
  - 9) **Tian-Sheng H, Datiles M, Kinoshita JH**: Reversal of galactose cataract with sorbinil in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 640—644, 1983.
  - 10) 茨木信博, 松本康宏, 照林宏文, 池部 均, 辻 俊明, 赤木好男, 他: ラットガラクトース白内障の発症・進展について, その2. 眼紀 41: 1004—1009, 1990.
  - 11) **Unakar NJ, Tsui JY, Johnson MJ**: Preeeding of aldose reductase inhibitor and galactose cataractogenesis. *Curr Eye Res* 8: 997—1010, 1989.
-